

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 00188857 B1
(43)Date of publication of application: 13.01.1999

(21)Application number: 960067997
(22)Date of filing: 19.12.1996

(71)Applicant: DOOSAN INSTITUTE
(72)Inventor: BAEK, UN HWA
CHOI, U SEOK
HONG, SEONG YONG
PARK, JANG SEO

(51)Int. Cl. C12N 1/16

(54) ISOLATION METHOD OF YEAST STRAIN PICHIA CIFERRII DSCC 7-25 HAVING EXCELLENT FERMENTATION PRODUCTIVITY OF SPHINGOLIPID

(57) Abstract:

PURPOSE: An isolation method of yeast strain Pichia ciferrii DSCC 7-25 having an excellent fermentation productivity of sphingolipid is provided, which maximizes production of TAPS(tetra acetyl phytosphingosine).

CONSTITUTION: An isolation method of Pichia ciferrii DSCC 7-25(KFCC-10937) is characterized by comprising the following steps: (i)after shake culturing a diploid ATCC-14091 strain on YMgl medium comprising yeast extract 0.2-0.4%, malt extract 0.2-0.4%, peptone 0.3-0.7%, glycerol 2.5-3.5%, spreading on spore formation plate medium comprising malt extract 3-7%, agar 4-5%; (ii)selecting bio-mass colony by adding thermal shock to a formed colony; (iii)after culturing the selected single spore derivative on YMgl plate medium again, selecting a strain which secretes a lot of sphingolipid crystal out of a cell; (iv)selecting finally a strain having high TAPS productivity by TLC analysis.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19961219)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (19981023)
Patent registration number (1001888570000)
Date of registration (19990113)

공고특허10-0188857

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)(51) Int. Cl. 6
C12N 1/16(45) 공고일자 1999년06월01일
(11) 공고번호 10-0188857
(24) 등록일자 1999년01월13일

(21) 출원번호	10-1996-0067997	(65) 공개번호	특1998-0049305
(22) 출원일자	1996년12월19일	(43) 공개일자	1998년09월15일
(73) 특허권자	두산인재기술개발원연구조합 백운화 경기도 용인시 수지읍 성북리 39-3 주식회사두산 한일성 서울특별시 영등포구 문래동6가 13		
(72) 발명자	백운화 서울특별시 서대문구 연희 3동 48-2 박장서 경기도 과천시 별양동 주공APT 710동 401호 홍성용 서울특별시 강남구 압구정동 한양APT 51동 406호 최우석 경기도 군포시 산본 2동 럭키백합APT 1126동 603호		
(74) 대리인	최성우		

심사관 : 김형준

(54) 스펡고리피드의 발효생산성이 우수한 신규한 효모균주 피키아 시페라이 DSCC 7-25의 분리 방법

요약

본 발명은 2배체인 피키아 시페라이(*Pichia ciferrii*) ATCC-14091호로부터 단일포자 유도체를 분리하여 테트라아세틸파이토스핑고신(TSPS) 생산성이 우수한 새로운 균주인 DSCC 7-25의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세히는 2배체인 ATCC-14091호 균주를 YMgl 배지에서 진탕배양후 포자형성 평판배지에 도말하고 형성된 포자를 열충격을 가하여 형성된 균체 집락을 선별한 후, 선별된 단일포자 유도체를 다시 YMgl 평판 배지에서 배양후 세포 밖으로 분비되는 스펡고리피드의 결정이 많은 균주를 다시 선별하여, TLC 분석으로 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 생성량이 높은 균주를 최종 선발함을 특징으로 하는 피키아 시페라이 DSCC 7-25(기탁번호 DFCC-10937호)의 분리방법에 관한 것이다. 또한 본 발명의 균주는 DSCC 7-25는 현재 TAPS 생산균주로 일반적으로 사용되고 있는 피키아 시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)와 비교하여 배양속도가 빠르고 TAPS의 생산 수율도 높은 새로운 *P. ciferrii* 균주다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 2배체인 피키아 시페라이(*Pichia ciferrii*) ATCC-14091호로부터 단일포자 유도체를 분리하여 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산성이 우수한 새로운 균주인 DSCC 7-25의 분리방법에 관한 것이다.

1960년 위커햄과 스토돌라(Wickerham, L.J. and Stodola, F.H.)는 효모한세놀라 시페라이(*Hansenula ciferrii*) NRRL 14091이 세포 밖으로 스펡고리피드를 분비하여 고체배지 주변에 결정을 형성하는 것을 최초로 발견하였다. 그러나 액상의 배지에서 배양되었을 때는 거의 스펡고리피드를 생성하지 못했다.(J.Bacteriol. 80 : 484-491, 1960). 반면 2배체인 14091의 표자로부터 분리된 1배체 F-60-10(NRRL 1301)의 경우 액상의 배지에서도 상당량의 스펡고리피드를 분비 생성하는 것이 보고되었다(Maister, L.G. et al., Appl. Microbiol. 10 : 401-406, 1962). 최근에 한세놀라 시페라이는 피키아 시페라이(*Pichia ciferrii*)로 분류속이 변경되었으므로 이후에는 피키아 시페라이로 사용하기로 한다(Barnett et al., 1990).

일반적으로 스프링고신(sphingosine) 혹은 파이토스핑고신(phytosphingosine)에 N-아실레이션(N-acylation) 과정을 거쳐 지방산이 결합되면 세라마이드(ceramide)라고 통칭되는 스프링고리피드를 형성하게 된다. 세라마이드는 피부의 표층(stratum corneum)을 구성하는 구조지질로서 과도한 수분의 증발을 막음으로써 피부의 건조 및 노화를 방지하는 역할을 하는 것으로 알려졌다. 실제로 한 연구결과에 따르면 나이가 들에 따라 피부조직을 구성하는 지질중에 세라마이드의 함량이 줄어드는 것으로 관찰되었다. 사람의 피부조직에는 6가지 유형의 세라마이드가 발견되고 있다. 사람의 피부조직을 구성하는 세라마이드와 화학적 기본구조가 동일한 세라마이드를 피부로부터 공급하면 피부의 노화를 방지하고 아울러 피부보습 효과가 있는 것으로 알려지게 되었다. 최근에 들어 세라마이드를 피부화장품의 활성조성물로 사용하기 시작하면서 세라마이드의 수요가 급증하고 있다. 종래에는 동물의 조직이나 기타 천연물에서 추출한 세라마이드 혼합물이 주요 공급원이었으나 광우병으로 알려진 병원체를 비롯한 전염성 인자들의 오염 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 식물성 세라마이드나 효모 등의 비병원성 미생물에서 추출된 세라마이드로 대체되기 시작했다.

피키아 시페라이는 비병원성 효모이며 세라마이드 합성의 전구물질인 파이토스핑고신을 발효에 의한 대량생산하기에 적합한 미생물로 사용되기 시작했다. 파이토스핑고신은 일반적으로 식물 및 효모 등의 세라마이드를 구성하는 기본구조를 이루는 물질이다. 사람의 피부조직에서는 세라마이드 3와 6b의 기본구조를 이루고 있다. 피키아 시페라이가 세포 밖으로 분비하는 파이토스핑고신은 아세틸기로 치환된 형태로 치환된 아세틸기의 수에 따라 테트라아세틸(tetraacetyl-), 트리아아세틸(triacetyl-), 다이아세틸파이토스핑고신(diacetylphyto-sphingosine) 등이 보고되고 있다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

PCT/GB93/02230에 개시된 바에 의하면 단일포자 접합형 F-60-10(NRRL1301)을 이용한 테트라아세틸파이토스핑고신의 대량 발효생산을 보고하고 있다. 유가식 발효조건에서 최대 45~50mg TAPS/gdw 생산 수율을 나타내었으며 절대생산량은 2.7g/L 이었다. 그러나 이 특허 문헌에 의하면 F-60-10의 생산수율은 23mg TAPS/gdw에 불과할 뿐 아니라 배양일수도 7일로서 모균주인 P.ciferrii ATCC 14091 의 3~4일 보다 2배나 길므로써 생산성(productivity)이 낮아진게 된다. 결론적으로 보다 생산성이 높은 우수한 균주 개량의 필요성이 제기되고 있다. 돌연변이에 의한 TAPS 생산균주의 개량시도가 EP 0 688 871 A2에 보고되어 60%의 수율 향상을 이루었다. 그러나 변이시킨 모균주가 F-60-10으로서 배양일수를 단축시켰다는 보고는 없다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 2배체인 피키아 시페라이(Pichia ciferrii) ATCC-14091호로부터 단일포자 유도체를 분리하여 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS) 생산성이 우수한 새로운 균주인 DSC 7-25의 분리방법에 관한 것이다. 또한 본 균주는 한국중균협회내의 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC-10937호로 1996년 11월 27일 기탁하였다. DSCC 7-25는 현재 TAPS 생산균주로 일반적으로 사용되고 있는 피키아시페라이 NRRL-1031호(F-60-10)와 비교하여 배양속도가 빠르고 TAPS의 생산수율도 높은 새로운 P. ciferrii 균주다.

2배체인 ATCC-14091호 균주를 YMgl 배지에서 진탕배양후 포자형성 평판배지에 도말하고 형성된 열충격을 가하여 형성된 균체 집락을 선별한다. 선별된 단일포자 유도체를 다시 YMgl 평판 배지에서 배양후 세포 밖으로 분비되는 스프링고리피드의 결정이 많은 균주를 다시 선별한다. 마지막으로 TLC 분석으로 TAPS의 생성량이 높은 균주를 최종 선발하고 이 균주를 피키아 시페라이 DSCC 7-25로 명명하였다(기탁번호 KFCC-10937호).

이때 사용되는 YMgl 배지의 조성은 효모추출물 0.2~0.4%, 맥아추출물 0.2~0.4%, 펩톤 0.3~0.7%, 글리세롤 2.5~3.5%가 함유된 수용액 배지이다. 또한 포자형성평판배지의 조성은 맥아추출물 3~7%, 한천 4~5%가 함유된 평판 배지이다.

또한 단일포자 유도체 선별 배지인 YMgl 평판배지는 EGTA를 2~30mM 함유함을 특징으로 한다.

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

따라서 본 발명은 보다 향상된 TAPS 생산성을 가지는 새로운 피키아 시페라이 균주를 육종하기 위하여 모균주인 피키아 시페라이 ATCC-1409호로부터 새로운 단일포자 유도체를 선별한 것이다. 2배체에서 분리된 1배체들 사이에 TAPS의 생산량이 현저히 차이가 나는 것이 관찰되었으며, 이는 포자형성 과정에서 TAPS 생합성에 관련된 유전인자들의 재배합의 결과로 생각된다. 따라서 새로운 1배체들 중에서 기존의 NRRL F-60-10 보다 우수한 균주를 선별하기 위해 모균주인 피키아 시페라이 ATCC-14091호의 포자형성을 유도한 후, 단일포자를 분리하였다. 단일포자의 분리시 배지에 EGTA를 첨가하여 EGTA에 내성을 보이는 균주선별을 유도하였다. 효모 사카로마이세스 세레비시에의 연구에서 Ca

**이 스프링고리피드 생합성 과정의 조절작용에 관계하며, 실제로 세린 팔미토일트랜스퍼레이즈(Serine Palmitoyltransferase)의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Zhao et al. JBC 269:21480-21488, 1994). EGTA는 Ca

** 이온을 제거하는 효과가 있다.

선별된 균주 Pichia ciferrii DSCC 7-25는 대수기의 균체 성장속도가 1.5시간 마다 2배로 증가하여 종래의 균주 F-60-10보다 높은 성장률을 보였으며 최대균체 측정량은 배양 3일째 O.D.600 = 58로 측정되었으나 F-60-10의 경우는 배양 7일째에도 O.D.600 = 21에 불과했다.

(실시예1) P. ciferrii ATCC 14091의 단일포자 유도체 선별

2배체인 ATCC 14091을 YMgl 배지(효모추출물 0.3%, 맥아추출물 0.3%, 페톤0.5%, 글리세롤 3%)에서 3일간 25℃로 진탕배양 후 포자형성 평판배지(맥아추출물5%, 한천 3%)에 배양액 0.1~0.5ml를 도말하여 실온에서 7~10일간 배양하면 모자모양의(hat-shape spore) 포자가 형성된다. 포자형성율은 6~8%로 높지않았다.

따라서 형성된 포자를 선택적으로 분리하기 위하여 형성된 포자를 선택적으로 분리하기 위하여 열충격(heat shock)을 가했다.

열충격은 포자 현탁액($6 \sim 10 \times 10^7$ cells/ml) 1~2ml을 시험관에 넣고 55℃에서 1~5분간 처리한 후 시간 별로 0.1ml 씩 EGTA가 2~30mM 포함된 YMgl 평판배지에 도말하여 25℃에서 배양했다. 형성된 균체집락 가운데에서 모균주와 집락형태, 색깔 및 크기등 이 다른 것들을 1차 선별하였다. 1차 선별된 400여개의 단일포자 유도체에 대한 2차 평가를 실시하여 50종을 선별하였다. 세포의 형태, 침강성 및 배양 시험관이 표면에 형성되는 소수성 피막의 정도를 2차 평가의 기준으로 삼았다. 이는 스팅고리피드를 세포 밖으로 분비하는 정도에 따라 세포의 표면이 소수성으로 변하면서 세포들이 한데 뭉쳐 덩어리를 형성하면서 침강성이 증가하는 점에 착안한 것이다. 이러한 성질은 배양 시험관의 표면에 피막형성과도 연관이 있다. *P. ciferrii*의 단일 포자 유도체들은 다양한 세포형태로 성장하는 것이 관찰되었다. 전형적인 효모형태, 효모형과 균사형이 섞여있는 형태, 대체로 균사형 등이 관찰되었다. 모균주인 ATCC-14091호는 효모형으로 존재한다.

2차 선별된 50종의 단일포자 유도체는 YMgl 평판배지에서 4일간 25℃로 배양한 후 4℃ 냉장고에 2~3일 동안 방치하여 세포 밖으로 분비되는 스팅고리피드의 결정화를 유도하였다. 실제 현미경 관찰을 통해 스팅고리피드의 결정이 많은 균주를 7종 최종 선별하였다. 결정의 형태는 균주에 따라 크게 3종류로 분류될 수 있다. 길고 직선형의 결정, 완만한 곡선들이 방사형으로 뻗어나온 형태, 눈송이 같이 짧고 다소 굽은 결정 등이다. 형성된 결정은 80℃의 오븐에서 약 30분 정도 가운을 하면 녹는 것이 관찰되었다. TLC 분석으로 TAPS 생성량이 높은 7가지 균주를 3차로 선별하였다. 선별된 7가지 균주에 대한 정량적 TAPS 분석은 HPLC로 실시하였으며 그 결과는 아래의 표 1과 같다.

[표1]

YMgl에서 TAPS 생성량

Strain	TAPS 생성량(mg/L)
14091	120
2-28	94
7-24	93
7-25	319
7-28	199
7-29	184
7-40	116
7-44	83
F-60-10	241

표에서 보는 바와 같이 단일포자 유도체 가운데 7-25가 제일 높은 TAPS 생성 율을 기록했다. 이는 기존에 TAPS 고생산균주로 알려진 F-60-10 보다도 30%이상 증가된 TAPS를 생산하였다. 이를 *Pichia ciferrii* DSCC 7-25로 명명하고 TAPS 생산의 최종 균주로 선정하였다.

(실시에 2) 파이토스핑고신의 추출 및 정량분석선별된 7종의 우수 선별균주가 생산하는 파이토스핑고신의 양을 정량적으로 측정하기 위하여 100ml의 YMgl, 25℃에서 4일간 진탕배양과 4℃에서 2일간 정지시킨 후 파이토스핑고신을 유기용매로 추출하였다. 대조군으로서 피키아 시페라이 F-60-10을 사용하였다. 추출된 파이토스핑고신은 TLC(Thin-Layer Chromatography), HPLC 등을 사용하여 정성/정량분석하였다. 파이토스핑고신의 추출법 및 정량법은 일반적인 지질 추출방법과 정량 분석법을 사용하였으되 다수의 샘플을 신속하고 효과적으로 분석하기 위하여 간편하고 소량의 샘플을 분석할 수 있는 방법을 고안하였다. 그 상세한 과정은 다음과 같다.

각 효모균주를 YMgl이 든 배플삼각플라스크에서 250rpm의 진탕조건으로 25℃에서 30℃ 사이의 배양온도에서 4일간 배양하였다.

배양 후 저온(4℃~6℃)에서 2~4일간 보관하였다. 균체를 포함하는 배양액(50ml)를 200ml의 클로로포름/메틸알코올(1:1)과 섞어 1시간 상온에서 잘 혼합하여 지질을 추출한 후 분액깔대기를 사용 용매층과 수용액층을 분리하였다. 회수된 용매층은 감압 농축시킨 후 다시 클로로포름/메틸알코올에 녹여 1차 TLC로 분석하였다, HPLC로 분석하였다. HPLC 분석은 ELSD(Electron Light Scanning Detector)를 사용하고 용매는 이소옥탄과 THF/포름산(100/1.5)의 희석비율을 9:1, 7:3, 9:1로 변화시키는 조건에서 실시하였다.

(실시예 3) 균체성장속도 및 균체량 측정선별된 우수균주 피키아 시페라이 7-25의 균체성장속도와 측정되는 최대균체량을 피키아 시페라이 F-60-10와 비교 측정하였다.

YMgl배지에서 전배양된 각각의 효모를 동일한 흡광도(O.D.600 = 0.05)가 되도록 YMgl 100ml에 접종하여 30℃, 250rpm으로 진탕하면서 배양하였다. 시간별로 샘플을 채취하여 흡광도(O.D.600)에서 측정하였다. 대수기의 균체성장 속도를 측정한 결과 피키아 시페라이 7-25는 1.5 시간마다 2배로 증가하였으나 피키아 시페라이 F-60-10은 3.0 시간마다 2배로 증식하는 것으로 측정되었다. 한편 최대의 균체 측정량은 7-25의 경우 배양 3일째에 O.D.600 = 58로 기록되었으나 F-60-10의 경우는 배양 7일째에 이르러서도 O.D.600 = 21에 불과했다.

파이토스핑고신의 아세틸화된 형태인 TAPS의 생성은 균체량에 비례하는 것으로 보고되었다. 따라서 산업적으로 생산성을 제고시킬 수 있으려면는 발효시 균체량을 빠른 시간에 극대화할 수 있어야한다. 균체량을 극대화 시키는 방법에는 유가식발효법을 사용할 수 있다, 그러나 발효시간의 단축은 대체로 균주 자체의 특성에 의해 결정되며, 산업적 측면에 있어서는 발효시간을 3~4일 단축시키는 것은 생산 원가절감에 크게 기여하는 요인이 된다.

[표2]

효모균주 DSCC 7-25와 F-60-10의 비교표

2배 증식시간 (hour)	DSCC 7-25	F-60-10
	1.5	3.0
바이오매스 농도 (g/L)	29.7	15
TAPS Titre (mg/L)	319 (70시간 배양)	241 (144시간 배양)

2배 증식시간 (hour)	DSCC 7-25	F-60-10
	1.5	3.0
TAPS의 특이수율 (mg/gdw)	10.7	16.1
용적 생산성 (mg TAPS/L/H)	4.6	1.7

배양조건 : YMgl(글리세롤 3%), 온도 25℃, 250rpm

발명의 효과

본 발명에 따른 균주 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호)를 이용하여 파이토스핑고신의 아세탈화 형태인 TAPS의 생성을 극대화 시킬수 있다. 이에따라 TAPS의 발효에 생산성을 제고시킬 수 있음은 물론 발효시간의 단축을 이룩하였다.

(57)청구의 범위

청구항1

2배체인 ATCC-14091호 균주를 YMgl 배지에서 진탕배양후 포자형성 평판배지에 도말하고 형성된 포자를 열충격을 가하여 형성된

균체 집락을 선별한 후, 선별된 단일포자 유도체를 다시 YMgl 평판 배지에서 배양후 세포 밖으로 분비되는 스팅고리피드의 결정이 많은 균주를 다시 선별하여, TLC분석으로 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 생성량이 높은 균주를 최종 선발함을 특징으로 하는 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호)의 분리방법.

청구항2

제1항에 있어서, YMgl 배지의 조성은 호모추출물 0.2~0.4%, 맥아추출물 0.2~0.4%, 펩톤 0.3~0.7%, 글리세롤 2.5~3.5%가 함유된 수용액 배지임을 특징으로 하는 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호)의 분리방법.

청구항3

제1항에 있어서, 포자형성 평판배지의 조성은 맥아추출물 3~7%, 한천 4~5%가 함유된 평판 배지임을 특징으로 하는 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호)의 분리방법.

청구항4

제1항에 있어서, 단일포자 유도체 선별 배지인 YMgl 평판배지는 EGTA를 2~30mM 함유시켜 TAPS 생성이 우수한 균주의 선별을 용이하게 함을 특징으로 하는 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호)의 분리방법.

청구항5

제1항의 방법에 따라 분리된 테트라아세틸파이토스핑고신(TAPS)의 생산성이 향상된 균주 피키아 시페라이 DSCC 7-25 (KFCC-10937호).